



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 01074

(22) Data de depozit: 22.12.2009

(41) Data publicării cererii:  
30.06.2011 BOPI nr. 6/2011

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL DE CERCETARE  
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA  
PLANTELOR,  
B-DUL ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,  
SECTOR 1, OP 18, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• ȘTEFAN AURORA LILIANA,  
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• LUPU CARMEN, INTRAREA BĂRSEI  
NR.5, BL.G3, SC.A, ET.2, AP.25,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) MEDIU DE CULTURĂ PENTRU DIFERENȚIEREA  
CIUPERCILOR FITOPATOGENE TOXIGENE DIN GENUL  
*FUSARIUM*

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o compoziție de mediu selectiv de cultură, pentru diferențierea ciupercilor toxigene din genul *Fusarium*, alcătuit din 32...34 părți ulei de măsline extravirgin, 0,095...1,05 părți fosfat diacid de potasiu, 0,095...1,05 părți azotat de potasiu, 0,095...1,05 părți sulfat de streptomycină, 0,740...0,760 părți pentaclornitrobenzen, 0,47...0,52 părți

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,47...0,52 părți KCl, 0,340...0,360 părți sulfat de neomicină, 0,240...0,270 părți polietilenglicol sorbitan monooleat, 0,19...0,21 părți Rodamină B, 19...21 părți agar și până la 1000 părți apă, părțile fiind exprimate în greutate.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## MEDIU PENTRU DIFERENȚIEREA CIUPERCILOR FITOPATOGENE TOXIGENE DIN GENUL *FUSARIUM*

Prezenta invenție se referă la un mediu pentru diferențierea ciupercilor toxigene din genul *Fusarium* destinat estimării riscului de infecție a boabelor de grâu în curs de formare cu ciuperci toxigene și de contaminare ulterioară cu micotoxine.

Sunt cunoscute o serie de medii și de procedee prin care sunt determinate fitopatogenitatea și/sau toxigenitatea unor populații / izolate de ciuperci din genul *Fusarium*.

Brevetul MD 4540 descrie o metodă de identificare a fitopatogenității unor izolate de ciuperci din genul *Fusarium*. Metoda propusă implică cultivarea izolatelor de ciuperci toxigene pe mediu nutritiv Czapek și determinarea activității  $\beta$ -glucuronidazice în filtratele culturii de 5 zile. Se consideră ca fiind fitopatogene acele izolate la care activitatea  $\beta$ -glucuronidazică este cuprinsă între 0,652 ... 1,183 U/ml. Metoda descrisă nu oferă soluții pentru diferențierea și/sau izolarea rapidă a tulpinilor de ciuperci fitopatogene din genul *Fusarium*, și în special a celor care sunt și toxigene.

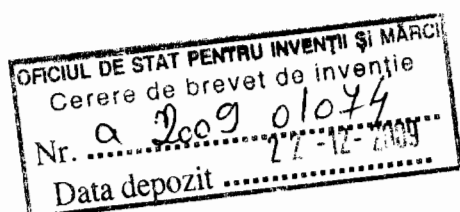
Schamele și colab. (2006, Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*, Phytopathology 96, 1021-1026). descriu un mediu pentru diferențierea și identificarea rapidă a sporilor atmosferici de *Fusarium graminearum* / *Gibberella zeae* depuși gravimetric pe suprafața plăcilor petri deschise și expuse peste noapte. Această soluție tehnică permite izolarea rapidă a ciupercilor din genul *Fusarium*, dar nu permite diferențierea celor fitopatogene și/sau toxigene.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție de mediu prin care să se realizeze izolarea din mediu și diferențierea rapidă a ciupercilor fitopatogene toxigene din genul *Fusarium*.

Compoziția de mediu selectiv pentru fusariile toxigene conform invenției este alcătuită din: 32 .. 34 părți de ulei de măsline extravirgin, 0,095 ... 1,05 părți de fosfat monopotasnic  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,095 ... 1,05 părți azotat de potasiu  $\text{KNO}_3$ ; 0,095 ... 1,05 părți sulfat de streptomycină; 0,740 ... 0,760 părți de pentacloronitrobenzen; 0,47 ... 0,52 părți de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,47 ... 0,52 părți de clorură de potasiu  $\text{KCl}$ ; 0,340 ... 0,360 părți de sulfat de neomicină; 0,240 ... 0,270 părți de polietilen glicol sorbitan monooleat; 0,019 ... 0,021 părți de Rodamină B, agar 19 ... 21 părți, apă până la 1000 de părți, părțile fiind exprimate în greutate.

Mediul realizat conform invenției prezintă următoarele avantaje:

1



- selectivitate ridicată datorită biocidale incluse în mediu, streptomycină, neomicină, pentacloronitrobenzen care limitează dezvoltarea bacteriilor și a ciupercilor microscopice care nu aparțin genului *Fusarium*;
- capacitate ridicată de a diferenția fusariile producătoare de lipaze extracelulare, care sunt fitopatogene și toxigene pentru că lipazele secretate reprezintă pentru ciupercile din genul *Fusarium* atât un factor de virulență cât și un factor implicat în biosinteza micotoxinelor.
- realizarea testelor de diferențiere ușor, fără a fi necesară aparatură complexă, reactivi costisitori și/sau personal cu înaltă calificare;
- realizarea testelor de identificare a hazardului microbiologic care generează riscul de contaminare a alimentelor cu fusariotoxine

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției:

Exemplu. Într-un flacon erlenmayer de 500ml gradat se introduc pe rând 0,1g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g  $\text{KNO}_3$ , 0,05g  $\text{MgSO}_4$ , 0,05 g  $\text{KCl}$ . Se adaugă 90ml apă distilată. Se încălzește la fierbere până la dizolvarea completă a tuturor ingredientelor și apoi se menține pe baie de apă la 50 ... 55°C. Peste soluția menținută la 55°C se adaugă 0,075 mg pentacloronitrobenzen. Se verifică pH-ul care trebuie să fie de  $7.0 \pm 0,1$ . Se corectează dacă este nevoie cu soluții de  $\text{KOH}$  1N sau  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N. Se aduce volumul final la 100ml, se astupă paharul erlenmayer cu dop de vată, și apoi se autoclavează la 121°C, timp de 20min. Mediul autoclavat se răcește la 60°C, după care se adaugă 10 ml emulsie lipidică sterilă cu rodamină B. Se omogenizează în condiții aseptice pe baie de apă termostată la 60°C și se menține apoi aprox. 10 min la 60... 62°C pentru eliminarea spumei formate. Mediul se răcește apoi la circa 55°C, și se adaugă câte 1 ml de soluții de antibiotice sterilizate prin filtrare, respectiv 1 ml soluție de sulfat de streptomycină 0,1 g /ml și 1 ml soluție de sulfat de neomicină 0,035g/ml.

Prepararea emulsiei lipidice sterile se realizează după cum urmează: într-un erlenmeyer de 250 ml se aduc: 250μl de Tween 80 (polietilen glicol sorbitan monooleat), 30 ml de ulei de măsline extravirgin și 50 ml de apă distilată. Se omogenizează emulsia la waring blender, se lasă să se disperseze spuma, se corectează pH-ul la 7,0, se acoperă cu dop de vată fixat cu folie și apoi se sterilizează la 121°C timp de 30 min. Se răcește la circa 60°C, se trece pe baie de apă termostată la 60 ... 62°C și se adaugă 20 ml soluție de rodamină B 1mg/ml sterilizată prin ultrafiltrare

Selectivitatea mediului realizat conform invenției a fost analizată cu cea a mediilor de mai jos.

Czapek-Dox-Iprodione-Dicloran Agar (CZID) (Abildgren *et al.*, 1987), obținut din Czapek Dox agar (Merck) 35 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,005 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



0,001 g cloramfenicol 0,05 g; dicloran 0,002 g; apă până la 1000 ml. Mediul s-a autoclavat la 121°C, timp de 30 min. Când mediul s-a răcit la circa 55°C s-a adăugat câte 1 ml din soluții sterile care conțineau: penicilină 50 mg /ml; sulfat de streptomycină 50 mg /ml; Rovral (iprodone) 6 mg/ml;

Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (Nirenberg, 1981); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g; KNO<sub>3</sub> 1 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g; KCl 0,5 g; glucoză 0,2 g; zaharoză 0,2 g; agar 20 g Malachit Green Agar (MGA) (Castello *et al.*, 1997) Peptonă 15 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g; Malachite Green sare oxalat, 10 ml soluție 25 mg% (2,5 mg); ampicilină 0,5 g. Mediul s-a autoclavat la 121°C, timp de 30 min. Când mediul s-a răcit la circa 55°C s-a adăugat 2 ml dintr-o soluție stoc rifampicină, rezultată prin dizolvarea a 0,5g în 100 ml 95% etanol.

Mediu *Fusarium* selectiv (FS) (Nash și Snyder, 1962) cu următoarea compoziție: bactopectonă 15 g, mediu pulbere cartof glucoză agar (Difco) 39 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, pentacloronitrobenzen 0,2 g, agar 15 g. Mediul s-a autoclavat la 121°C, timp de 30 min. Când mediul s-a răcit la circa 55°C s-a adăugat câte 1 ml din soluții sterile care conțineau: sulfat de streptomycină 300 mg /ml, ampicilină 100 mg/ml

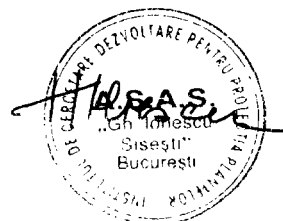
Mediu *Fusarium* selectiv modificat (FSM) (Schmale *et al.* 2006), cu următoarea compoziție: 15 g bactopectonă, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, pentacloronitrobenzen 0,750 g, agar 15 g. S-a răcit la 55°C, după care s-au adăugat câte 10 ml de soluții de antibiotice sterilizate prin filtrare, 10 ml soluție de sulfat de streptomycină 0,1 g /ml și 10 ml soluție de sulfat de neomicină 0,035g/ml.

Tab. 2. Selectivitatea mediilor de cultură testate pentru fusariile toxigene.

Mediu	Aprecierea selectivității				
	<i>Fusarium / Asperg.</i>	<i>Fusarium/Drechslera</i>	<i>Fusarium /Mucor</i>	<i>Fusarium/Penicillium</i>	<i>Fusarium/Rhizopus</i>
CZID	5	5	3	5	4
SNA	4	4	5	3	5
FS	3	3	4	4	3
FSM	1	2	2	1	2
cf. ex.	2	1	1	2	2

<sup>a</sup> - Note pe o scara de la 1 la 5, prin compararea creșterii între diferitele specii de ciuperci microscopice pe fiecare dintre medii.

Selectivitatea mediilor a fost testată prin inocularea plăcilor petri 67x15 mm cu amestecuri de suspensii de spori de *Fusarium graminearum* în combinație cu



*Aspergillus flavus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Drechslera turcica*, *Botrytis cinerea*, *Mucor mucedo*, *Penicillium expansum*. S-a incubat timp de 7 zile și a fost comparată creșterea diferitelor specii de ciuperci microscopice pe fiecare dintre medii. Notele acordate diferitelor medii testate în cadrul acestei etape în privința selectivității pentru ciupercile fitopatogene din grupul *Fusarium graminearum* sunt prezentate în tabelul 1. Se remarcă faptul că selectivitatea mediilor FS, FSM și cf. ex.(conform exemplu) este apropiată, în toate cazurile factorul major de selectivitate este pentacloronitrobenzen, un fungicid care este inactiv față de ciupercile microscopice din genul *Fusarium*. Mediul conform invenției mai este selectiv și prin compoziția sa minimală.

Capacitatea mediilor de a permite diferențierea rapidă a sporilor atmosferici de fusarii toxigene a fost testată prin expunerea în aer liber a mediile comparate, fiecare dispus într-o serie de 5 plăci petri deschise (90 mm în diametru; suprafața = 283 mm<sup>2</sup>). Plăcile au fost amplasate pe un suport în formă de T, la nivelul inflorescențelor de grâu și porumb (fig. 1, a, b) și lăsate peste noapte. Apoi s-au închis, s-au preluat din câmp în laborator și s-au incubat timp de 24 ore, la 25°C și la întuneric. Numărul de colonii puse în evidență rapid pentru diferitelor medii sunt prezentate în tab. 2.

Tab. 2. Capacitatea mediilor de cultură testate pentru diferențierea rapidă a sporilor atmosferici prelevați după expunere în aer liber.

Mediu	Număr total de colonii	Colonii identificate ca <i>Fusarium</i>
CZID	128±20	44±4
SNA	108±24	42±8
FS	84±16	36±8
FSM	64±20	48±4
MSF	56±12	48±8

Datele prezentate în tab. 1 și 2 demonstrează o selectivitate ridicată a mediului MSF, realizat în cadrul acestei etape, în a izola specific din aer spori de *F. graminearum* / *Gibberella zeae*. În plus acest mediu are caracteristica de a izola exclusiv ciuperci microscopice din genul *Fusarium* care produc o lipază extracelulară, deci care au un potențial toxigenic ridicat. Ciupercile care produc lipază se evidențiază printr-un halou produs pe mediul (care este opalescent și ușor rozaliu datorită complexului ulei de măsline – rodamină B). Acest halou este fluorescent la iluminare cu lumina ultravioletă.



## MEDIU PENTRU DIFERENȚIEREA CIUPERCILOR FITOPATOGENE TOXIGENE DIN GENUL *FUSARIUM*

### Revendicare

1. Compoziție de mediu selectiv pentru fusariile toxigene caracterizată prin aceea că este alcătuită din: 32 .. 34 părți de ulei de măsline extravirgin, 0,095 ... 1,05 părți de fosfat monopotasic  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,095 ... 1,05 părți azotat de potasiu  $\text{KNO}_3$ ; 0,095 ... 1,05 părți sulfat de streptomycină; 0,740 ... 0,760 părți de pentacloronitrobenzen; 0,47 ... 0,52 părți de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,47 ... 0,52 părți de clorură de potasiu  $\text{KCl}$ ; 0,340 ... 0,360 părți de sulfat de neomicină; 0,240 ... 0,270 părți de polietilen glicol sorbitan monooleat; 0,019 ... 0,021 părți de Rodamină B, agar 19 ... 21 părți, apă până la 1000 de părți, părțile fiind exprimate în greutate.

